

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 1日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792080

研究課題名（和文）心肺補助循環時の血小板減少症の機序解明と生理活性物質による予防法・治療法の開発

研究課題名（英文）Mechanisms underlying the platelet decrease in extracorporeal circuit, and the development of new therapy using physiological activators.

研究代表者

加藤 祐子（KATO YUKO）

京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医

研究者番号：50398400

研究成果の概要（和文）：人工心肺を含む体外循環後に起こる血小板減少に関する機序についての研究を行った。人工心肺下心臓手術周術期の血小板において細胞内 p38 MAPK リン酸化と Bax の亢進が観察された。そこで次に Bax ノックダウンまたは、Bcl-x1 ノックダウン血小板様細胞を用いて、ずり応力及びトロンビン負荷を与える実験を行うと、Bax ノックダウン血小板細胞は細胞死変化が抑制される一方で、Bcl-x1 ノックダウン血小板様細胞は細胞死変化が亢進した。また、血小板凝集能は血小板の細胞死変化と反比例して変化した。以上の結果から、血小板の細胞死が、体外循環後の血小板機能低下及び血小板数低下に関与していることが示唆された。また、レゾルビン D の投与によりこれらの変化が軽減したことから血小板減少の新しい予防法になる可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：We first investigated the mechanisms underlying the platelet decrease after extracorporeal circuit. In patients undergoing cardiac surgery with cardiopulmonary bypass, intraplatelet p38MAPK phosphorylation and Bax expression were increased. Then, we investigated whether Bax or Bcl-x1 knockdown platelet modifies cell death changes by thrombin and shear stress application. Bax knockdown platelets inhibited cell death changes, while Bcl-x1 knock out platelets accelerated cell death changes. Accordingly, our findings indicate that platelet cell death play an important role in platelet dysfunction after extracorporeal circuit.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：遺伝子治療、体外循環

## 1. 研究開始当初の背景

有核細胞の細胞死の過程は広く知られているが、無核細胞の血小板における細胞死に関しては不明な点も多い。特に我々は可逆的

な細胞死の進行過程に注目している。救急患者や、心臓血管手術周術期患者において使用する経皮的な心肺補助装置（PCPS）を長時間使用すると、血小板機能低下または血小板数減少が要因による止血凝固能傷害に悩まされ

る。その機序として過度の血小板活性化とその後引き続き起こる血小板細胞死の現象が関与していると考えた。動物モデルと、分子生物学的手法を用いた遺伝子ノックダウン血小板細胞および生理活性(細胞透過性を含む)ペプチドを用いて、血小板細胞内情報伝達系を中心とした機序の解明と今後の新しい予防法ならびに治療法の方向性を導きたいと考えた。

研究代表者は、前回の科学研究費助成課題若手(B) ”miRNAによるRNA干渉効果を用いた新しい血小板遺伝子ノックダウン手法の開発”において培養細胞を用いて遺伝子ノックダウン血小板、または血小板様細胞の作成を行った。しかし、2年間の研究機関で当初の目的のすべてが達成出来なかったため、今回の研究期間において継続したテーマに関する研究を施行した。

## 2. 研究の目的

- (1) 人工心肺下手術における血小板細胞死の周術期の変化を細胞死に関与する細胞内情報伝達系の変化と同時に観察する。
- (2) 心肺補助装置における血小板減少の機序を、ヒト正常血小板細胞、遺伝子ノックダウン血小板細胞を用いて *In Vitro* 実験系で解明すること。
- (2) 細胞透過性ペプチド、生理活性ペプチドを用いて、今後の血小板保護に関する予防法、治療法の方向性を見いだすこと。

## 3. 研究の方法

- (1) Bax, Bcl-x1, P38 $\alpha$ , Akt 各々遺伝子ノックダウン血小板細胞に Shear Stress 又はトロンビン負荷を与えた場合の経時的細胞死変化を定量評価する。( *In Vitro* 系)

ヒト遺伝子ノックダウン血小板細胞を以下

の行程で作成する。

- ① miRNA の作成 Bax, Bcl-x1, p38 $\alpha$ , Akt をターゲットにした miRNA 塩基配列作成は、Invitrogen 社で Ready Made の DNA64mer の人工 miR RNAi インサートを購入。
- ②アニーリング及びクローニング Double Strand にアニーリング後 pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR にクローニングする。
- ③遺伝子導入 Meg-01 細胞(培養細胞)に Electroporation 法で導入後、目的遺伝子がノックダウンされているか、Real Time PCR(RNA レベル)及び、Flow Cytometry 法(蛋白レベル)で確認。
- ④血小板に分化するようサイトカインを含んだ培養液 (IMDM with 1.5%BSA, Thrombopoietin, IL-6, IL-1b 各 10ug/ml, Stem cell factor 50ng/ml) に培養する。血小板に分化後(約1-2 week)、Real Time PCR 及び、Flow Cytometry 法で、ターゲット遺伝子のノックダウンを確認する。
- ⑤遺伝子ノックダウン血小板様細胞において刺激後の血小板において、以下の項目を確認
  1. 血小板凝集反応 (透過法)
  2. 血小板 Ca 放出反応 (Fluoro-3, フローサイト法)。
  3. 血小板内キナーゼリン酸化解析 ERK, AKT, p38, JNK のリン酸化/Total(比)変化の定量 (フローサイト法)。
  4. 血小板ミトコンドリア膜電位変化の定量 (JC-1 染色、フローサイト法)
  5. 血小板ミトコンドリアチトクローム C 含量の変化 (ウェスタン、フローサイト法)
  6. 血小板膜表面へのホスファチジルセ

リンの発現変化 Annexin V<sup>+</sup> (フローサイト法)

7. 血小板内 Bcl-2 ファミリータンパク質の発現の変化 Bcl-x1, Bcl-2, Bax, Bak, Bim 発現の変化 (フローサイト法)
8. 血小板内カスパーゼ発現の変化 Caspase 3, 9 (フローサイト法)

(2) また、細胞透過性ペプチド、生理活性ペプチドを用いて、今後の血小板保護に関する予防法、治療法の方向性を見いだすこと。(In Vitro系)

(1) の実験において、あらかじめ脂質メデイエーターのリゾルビンを投与することでどのような効果をもたらされるかを観察する。

### (3) 研究成果

人工心肺手術下心臓手術において、人工心肺離脱後の血小板凝集能の低下と、血小板内 p38MAPK, JNK のリン酸化の上昇および血小板表面の Phosphatidylserine、また血小板内 Bax 発現、ミトコンドリア内チトクローム C 低下に相関関係が有ることを見出した。また In Vitro 実験系において血小板内 p38MAPK のリン酸化を抑制することで細胞死誘導タンパクの 1 つとして知られている血小板内 Bax のミトコンドリア内移行が抑制されたため、p38MAPK 経路の活性化が血小板細胞死において重要な経路であることが示唆された。また、人工心肺時間が短時間の場合には上記の変化が軽微であり、人工心肺終了時に一旦血小板凝集能は低下するものの 24 時間以内に回復する現象が見られた。これらより、血小板の傷害の程度に応じた細胞死(アポトーシス)変化が、血小板凝集能低下の最大の要因であり、血小板障害が軽微で有る場合、アポトーシス(細胞死)の進行が可逆的であると我々は考えた。

次に、この現象が In Vitro 実験系で再現可能か否かを遺伝子ノックダウン血小板細胞を用いて実験を試みた。ウィルスベクターを使用せず簡便に遺伝子導入が可能で、短期間で遺伝子ノックダウン血小板様細胞を作成できる Meg-01 細胞(巨核芽球培養細胞)を用いた。またこの血小板様細胞がトロンビン及びコラーゲンにより血小板凝集が可能であることを確認した。

この細胞を用いて以下の実験結果を得た。Bax遺伝子ノックダウン血小板様培養細胞は、コントロール遺伝子を導入した細胞に比べトロンビン負荷及びびずり応力負荷による血小板刺激に対し、血小板凝集PAC-1、CD62Pの発現が同様に見られたことから血小板活性化にはBaxは影響を及ぼさない事がわかった。

一方で、Bax遺伝子ノックダウン血小板様培養細胞において、ミトコンドリア内チトクロームCの低下およびカスパーゼ9, 3の発現の上昇が、抑制された。よってこれらの実験結果は、Bax遺伝子ノックダウン血小板様培養細胞は、コントロールの遺伝子を導入した細胞に比べ細胞死の過程が抑制されたと考えられる。

さらに、Bcl-xL遺伝子ノックダウン血小板様培養細胞は、コントロールの遺伝子を導入した細胞に比べトロンビン負荷またはびずり応力付加による血小板刺激に対し細胞死が亢進した。これらの実験結果は、Bax遺伝子ノックダウン血小板様培養細胞の結果と相反するものであり、BaxとBcl-xLの作用が相反することを示す傍証となると考えられる。

また、生理活性物質のResolvin D2の前投与により血小板内Baxの発現が阻害されることで、ミトコンドリア内チトクロームCの低下およびカスパーゼ9, 3の発現の上昇が抑制されることで、血小板細胞死が抑制された。よって、これらの生理活性物質の今後の可能性が期待される結果となった。

これらの研究結果は、学会、研究会等で報告予定である。しかし、研究結果の詳細についてはさらに検討する必要がある、今後の研究展開に期待される。

(3) 連携研究者  
該当無し

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

敗血症時におけるmicroRNAによるマクロファージ食能の制御 日本麻酔科学会学術集会第60回大会 飯田淳, 中嶋康文, 石井祥代, 村瀬百子, 加藤祐子, 佐和貞治 2013年05月23日  
～2013年05月25日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤祐子 (KATOH YUKO)

京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医

研究者番号: 50398400

(2) 研究分担者

該当無し